



DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS (PCT)

(51) Classification internationale des brevets ⁶ : C07H 21/00, C12Q 1/68	A1	(11) Numéro de publication internationale: WO 99/07722 (43) Date de publication internationale: 18 février 1999 (18.02.99)
(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR98/01737 (22) Date de dépôt international: 4 août 1998 (04.08.98) (30) Données relatives à la priorité: 97/09961 4 août 1997 (04.08.97) FR (71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US): INSTITUT PASTEUR [FR/FR]; 28, rue du Docteur Roux, F-75015 Paris (FR). (72) Inventeurs; et (75) Inventeurs/Déposants (US seulement): GRIMONT, Patrick [FR/FR]; 207, rue de Vaugirard, F-75015 Paris (FR). REGNAULT, Béatrice [FR/FR]; 63, avenue du Général Leclerc, F-78220 Viroflay (FR). COLLIN, Monique [FR/FR]; 9, avenue de Stalingrad, F-92220 Bagneux (FR). (74) Mandataires: MARTIN, Jean-Jacques etc.; Cabinet Regimbeau, 26, avenue Kléber, F-75116 Paris (FR).		(81) Etats désignés: AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZW, brevet ARIPO (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SZ, UG, ZW), brevet eurasién (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet européen (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG). Publiée Avec rapport de recherche internationale.
(54) Title: OLIGONUCLEOTIDE SPECIFIC OF THE <i>ESCHERICHIA COLI</i> SPECIES AND METHOD FOR DETECTING AND DISPLAYING BACTERIA OF THIS SPECIES (54) Titre: OLIGONUCLEOTIDE SPECIFIQUE DE L'ESPECE <i>ESCHERICHIA COLI</i> ET PROCEDE DE DETECTION ET DE VISUALISATION DES BACTERIES DE CETTE ESPECE (57) Abstract <p>The invention concerns an oligonucleotide capable of being specifically hybridised with the ribosomal RNA (RNAr) or with the corresponding gene (ADNr) of the <i>Escherichia coli</i> genomic species (including all the <i>Shigella</i> genomic species except for serotype 13 <i>S. boydii</i>/<i>Escherichia fergusonii</i> genomic species. The invention also concerns a method for detecting and displaying the bacteria of said species.</p> (57) Abrégé <p>L'invention concerne un oligonucléotide capable de s'hybrider spécifiquement à l'ARN ribosomal (ARNr) ou au gène correspondant (ADNr) de l'espèce génomique <i>Escherichia coli</i> (incluant toutes les <i>Shigella</i> à l'exception de <i>S. boydii</i> sérotype 13/<i>Escherichia fergusonii</i>. Elle concerne également un procédé de détection et de visualisation des bactéries de la susdite espèce.</p>		

BEST AVAILABLE COPY

UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AL	Albanie	ES	Espagne	LS	Lesotho	SI	Slovénie
AM	Arménie	FI	Finlande	LT	Lituanie	SK	Slovaquie
AT	Autriche	FR	France	LU	Luxembourg	SN	Sénégal
AU	Australie	GA	Gabon	LV	Lettonie	SZ	Swaziland
AZ	Azerbaïdjan	GB	Royaume-Uni	MC	Monaco	TD	Tchad
BA	Bosnie-Herzégovine	GE	Géorgie	MD	République de Moldova	TG	Togo
BB	Barbade	GH	Ghana	MG	Madagascar	TJ	Tadjikistan
BE	Belgique	GN	Guinée	MK	Ex-République yougoslave de Macédoine	TM	Turkménistan
BF	Burkina Faso	GR	Grèce	ML	Mali	TR	Turquie
BG	Bulgarie	HU	Hongrie	MN	Mongolie	TT	Trinité-et-Tobago
BJ	Bénin	IE	Irlande	MR	Mauritanie	UA	Ukraine
BR	Brésil	IL	Israël	MW	Malawi	UG	Ouganda
BY	Bélarus	IS	Islande	MX	Mexique	US	Etats-Unis d'Amérique
CA	Canada	IT	Italie	NE	Niger	UZ	Ouzbékistan
CF	République centrafricaine	JP	Japon	NL	Pays-Bas	VN	Viet Nam
CG	Congo	KE	Kenya	NO	Norvège	YU	Yougoslavie
CH	Suisse	KG	Kirghizistan	NZ	Nouvelle-Zélande	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	République populaire démocratique de Corée	PL	Pologne		
CM	Cameroun	KR	République de Corée	PT	Portugal		
CN	Chine	KZ	Kazakstan	RO	Roumanie		
CU	Cuba	LC	Sainte-Lucie	RU	Fédération de Russie		
CZ	République tchèque	LI	Liechtenstein	SD	Soudan		
DE	Allemagne	LK	Sri Lanka	SE	Suède		
DK	Danemark	LR	Libéria	SG	Singapour		
EE	Estonie						

5 **OLIGONUCLEOTIDE SPECIFIQUE DE L'ESPECE**
***ESCHERICHIA COLI* ET PROCEDE DE DETECTION ET DE**
VISUALISATION DES BACTERIES DE CETTE ESPECE

10 L'invention concerne des oligonucléotides pour la détection et la
visualisation de bactéries appartenant à l'espèce génomique *Escherichia coli* dans un échantillon. Plus particulièrement, elle concerne un oligonucléotide capable de s'hybrider spécifiquement avec l'ARN ribosomal (ARNr) ou au gène correspondant (ADNr) de l'espèce génomique *Escherichia coli* (y compris les *Shigella* à l'exception de *S. boydii* sérotype 13) / *Escherichia fergusonii*.

15 Elle concerne également un procédé de détection de l'espèce génomique en question mettant en oeuvre cet oligonucléotide ainsi que l'utilisation dudit oligonucléotide dans un procédé d'amplification génique.

20 Le terme "*Escherichia coli*" (*E. coli*) désigne dans ce document l'espèce génomique (genomospecies) contenant la souche-type *Escherichia coli* ATCC 11775 (= CIP 58-8). Une espèce génomique est un ensemble de souches dont l'acide désoxyribonucléique (ADN) présente une homologie de plus de 70% avec l'ADN de la souche-type de l'espèce considérée avec une instabilité thermique de l'ADN hybridé inférieure à 5°C (Grimont, 1988; Wayne et al., 1987). Suivant ces critères, l'espèce génomique *E. coli* inclut, outre les souches habituellement identifiées comme *E. coli*, les souches traditionnellement classées comme *Shigella* (*S. dysenteriae*, *S. flexneri*, *S. boydii*, *S. sonnei*)
25 à l'exception du sérotype 13 de *S. boydii* (Brenner et al., 1973). En appliquant strictement ces critères, on peut arguer que *Escherichia fergusonii* appartient à l'espèce génomique *E. coli* (Farmer et al., 1985).
30

5 *E. coli* est habituellement une bactérie commensale du colon de l'homme et des animaux à sang chaud. Pour cette raison, sa présence dans un échantillon d'eau, d'aliment, ou de l'environnement, est interprétée comme une indication de contamination fécale (bactérie indicatrice). Ainsi, un produit alimentaire ne doit pas contenir plus d'un certain
10 nombre de cellules vivantes de *E. coli* (pouvant former une colonie sur un milieu de culture solide) dans une masse définie de produit (ces nombres varient selon les produits). Par exemple, l'eau potable ne doit pas contenir de cellule vivante de *E. coli* dans 100 ml (De Zuane, 1997). Le dénombrement des *E. coli* est essentiel pour apprécier la qualité
15 hygiénique d'un aliment.

Des souches de l'espèce génomique *E. coli* peuvent être pathogènes. Parmi ces souches se trouvent tout ce qui est communément appelé *Shigella*, agent des dysenteries bacillaires humaines. Les souches communément appelées *E. coli*, peuvent causer différentes infections de
20 l'homme ou des animaux selon l'équipement en gènes de pathogénicité (infections urinaires, diarrhées cholériformes ou hémorragiques, syndrome dysentérique, syndrome hémolytique et urémique, septicémie, méningite néonatale, infections purulentes diverses).

L'identification d'une souche de l'espèce génomique *E. coli*
25 (identification taxonomique) est importante pour suspecter ou démontrer la contamination fécale de l'eau ou des aliments. Elle est également importante dans le cas où la bactérie est isolée d'un milieu biologique normalement stérile ou presque (urine, sang, liquide céphalo-rachidien, collection liquidienne dans un tissu ou dans un espace fermé du corps).
30 Dans les espaces ouverts du corps (tube digestif) ou les fèces, la présence de *E. coli* est banale et l'identification des facteurs de pathogénicité de *E. coli* prime sur l'identification taxonomique.

5 L'identification taxonomique de *E. coli* repose classiquement sur l'isolement et la culture de la bactérie sur un milieu gélosé solide et l'application de quelques tests biochimiques. L'apparition de colonies sur un milieu gélosé demande au moins 18 heures. Dans le cas de
10 prélèvements de l'environnement, une culture de quelques jours est souvent nécessaire pour que toutes les colonies qui doivent se développer apparaissent. L'application de tests biochimiques à partir d'une colonie isolée demande encore 18 à 48 heures. A titre d'exemple, le dénombrement de *E. coli* dans l'eau nécessite la filtration d'un volume d'eau à travers une membrane stérile, le dépôt de la membrane sur un
15 milieu semi-sélectif et/ou indicateur, l'incubation (48 heures) permettant de faire se développer des colonies d'une couleur caractéristique (mais non absolument spécifique) qui sont alors comptées. Chaque colonie isolée étant supposée dérivée d'une cellule bactérienne, le dénombrement des *E. coli* par unité de volume peut être réalisé. Il est prudent de vérifier
20 que les colonies isolées correspondent bien à l'espèce *E. coli* et ceci demande au moins 18 heures de plus.

Récemment, des techniques fondées sur la détection de séquences nucléotidiques spécifiques de l'espèce génomique *E. coli* ont été décrites. Ainsi, la détection par amplification génique (type PCR) du gène codant
25 la bêta-glucuronidase permet d'identifier la présence de *E. coli* dans un échantillon. Cette méthode est surtout utilisée de manière qualitative et l'interprétation de l'amplification génique est fréquemment gênée par la possibilité d'une contamination due à la dispersion sur les appareils et outils expérimentaux de quelques fragments d'acide nucléique.

30 L'hybridation in situ est une alternative intéressante à l'amplification génique. Une sonde oligonucléotidique marquée (généralement par une substance fluorescente) pénètre dans les cellules bactériennes préalablement traitées pour faciliter cette étape. Selon que

5 les acides nucléiques ribosomiques ont ou non une séquence complémentaire (cible) à la sonde, la sonde se fixera sur sa cible et ne sera pas enlevée par lavage. Les bactéries ayant ainsi retenu la sonde deviennent marquées (par exemple, fluorescentes) et visibles par examen microscopique.

10 Les acides ribonucléiques ribosomaux (ARNr) constituent la cible préférée en hybridation in situ du fait du nombre de copies par cellule (10 000 à 30 000), plus élevé que le nombre de copies d'ARN messager après induction (100 à 200) ou d'un gène donné (une à quelques unes). Ces ARN ribosomaux (ARNr) sont identifiés d'après leur constante de
15 sédimentation (pour les bactéries: 5S, 16S et 23S), présents dans la petite sous-unité (ARNr 16S) ou la grande sous-unité (ARN 23S et 5S) du ribosome.

Les plus grands ARNr sont le 16S (environ 1500 nucléotides) et le 23S (environ 3000 nucléotides). Une sonde nucléique complémentaire
20 d'une partie d'un ARNr pourra s'hybrider avec cet ARNr mais aussi avec le brin complémentaire du gène (ADNr) qui a codé cet ARNr. Diverses applications de cette méthodologie ont été publiées (Amann et al., 1990; DeLong et al., 1989; Giovannoni et al., 1988; Trebesius et al., 1994).

Ces ARNr sont en fait apparus comme les molécules les plus
25 appropriées pour servir de chronomètre moléculaire de l'évolution des bactéries (Brenner et al., 1969; Doi & Iragashi, 1965; Moore et McCarthy, 1967; Pace & Campbell, 1971; Takahashi et al., 1967). La structure primaire (séquence) des ARNr contient des régions très conservées et d'autres qui sont hypervariables (Sogin et al., 1972; Woese
30 et al., 1975). La mise au point d'une méthode d'hybridation ADN-ARNr (Gillespie & Spiegelman, 1965) a été suivie d'un très grand nombre de publications appliquant cette approche à la taxonomie et la phylogénie

5 des bactéries et à l'identification de bactéries mal classées (Johnson et al., 1970; Palleroni et al., 1973; De Smedt & De Ley, 1977).

D'une façon générale, dans une expérience d'hybridation mettant en jeu des séquences données, le résultat dépend beaucoup de la température et de la molarité en ions sodium du milieu réactionnel. Pour
10 un milieu réactionnel de composition donnée, on définit une température optimale d'hybridation. Si l'on élève la température, les brins réassociés finiront par se séparer. La température nécessaire à cette séparation dépend de la longueur de la partie de séquence parfaitement hybridée (appariement parfait) et de sa composition en nucléotides. Une
15 température ne permettant que l'hybridation des séquences les plus longues est dite restrictive (par opposition à optimale). Des mésappariements lors de l'hybridation font chuter la stabilité thermique des molécules hybridées.

La spécificité de l'hybridation in situ va donc dépendre de la
20 qualité de la sonde capable de reconnaître et de s'hybrider avec une séquence complémentaire présente dans un ARNr.

Kohne et al. (1968) ont décrit une méthode pour préparer des sondes réagissant avec l'ARNr sans cependant indiquer comment détecter *E. coli* spécifiquement.

25 Göbel et Stanbridge (1984) utilisent un gène ADNr cloné pour détecter des mycoplasmes contaminant des cultures de tissus.

Galpin et al. (1981) ont utilisé l'hybridation des gènes codant l'ARNr pour détecter des infections à *Mycoplasma pulmonis* chez la souris.

30 US 4,851,330 décrit une stratégie pour obtenir des fragments d'acide nucléique utilisables comme sonde réagissant avec les ARNr.

WO-A-84/02721 décrit des méthodes pour détecter les microorganismes infectant un corps humain ou animal, en utilisant des

5 sondes qui hybrident avec les ARNr. Il n'est pas indiqué comment détecter ou identifier *E. coli*.

Berent et al. (1985) montrent l'intérêt des sondes oligonucléotidiques par rapport aux sondes clonées.

Le brevet français 2 596 774 propose l'utilisation d'un
10 oligonucléotide complémentaire de l'ARNr bactérien comme sonde et décrit deux sondes oligonucléotidiques universelles.

Göbel et al. (1987) utilisent un oligonucléotide de synthèse réagissant avec l'ARNr ou son gène, dans le but d'identifier des mycoplasmes.

15 US 5,084,565 décrit une sonde oligonucléotidique dite spécifique de *E. coli*. Cette sonde a pour cible la zone nucléotidique 465 à 477 (numérotation des nucléotides selon Brosius et al. [1978]). La sonde réagirait avec *Escherichia fergusonii* et *Shigella boydii* sérotype 13 (en plus de *E. coli* et *Shigella*) et ne réagirait pas avec *Citrobacter koseri*.
20 Rien n'est dit quant à la réaction de cette sonde avec les espèces du genre *Cedecea* qui sont phylogénétiquement proches de *E. coli*.

US 5,593,841 mentionne une sonde réagissant avec la région 995-1030 de l'ARNr 16S de *E. coli*. Cette sonde réagit avec *E. fergusonii* mais ne réagit pas avec toutes les souches de *E. coli* testées et ne réagit
25 pas avec *Shigella dysenteriae*. Rien n'est dit quant à la réaction de cette sonde avec *Citrobacter koseri* (= *C. diversus*) et les espèces du genre *Cedecea* qui sont phylogénétiquement proches de *E. coli*.

Kwok et al. (1990) ont montré qu'un mésappariement au niveau de l'extrémité 3' d'une amorce utilisée en amplification génique (PCR)
30 affectait l'efficacité de l'amplification.

Cha et al (1992) ont décrit un test appelé "Mismatch Amplification Mutation Assay" dans lequel, une amorce présente un mésappariement avec la séquence cible d'une mutation à détecter, et deux

5 mésappariements avec la séquence correspondante de l'allèle sauvage.
Ces mésappariements concernent la partie terminale 3' de l'amorce. Dans
ces conditions, leur système PCR ne détecte que l'allèle mutant. Cette
méthode a été appliquée à la détection spécifique de *Salmonella enterica*
sérotype *Enteritidis* (Lampel et al., 1996) en créant un mésappariement à
10 la pénultième position de l'extrémité 3' d'une amorce.

L'invention propose un oligonucléotide pour la détection et la
visualisation spécifiques et rapides de bactéries appartenant à l'espèce
génomique *Escherichia coli* dans un échantillon. Elle concerne donc un
oligonucléotide capable de réaliser une hybridation spécifique avec
15 l'espèce génomique de *Escherichia coli* (c'est-à-dire spécifique de toutes
les souches de *Escherichia coli*, de *Shigella* (à l'exception de *S. boydii*
sérotype 13) et de *Escherichia fergusonii*.

Plus particulièrement, cet oligonucléotide est capable de
s'hybrider avec la région 637-660 de l'ARN 16S de *E. Coli* (système de
20 numérotation de Brosius et al., 1978). En effet, cette portion de l'ARN
16S est assez bien conservée chez les Enterobactéries mais pas
suffisamment pour être spécifique de celles-ci. Cependant, de façon
surprenante, elle s'est avérée très intéressante en ce qu'elle permet la
détection de l'espèce génomique ci-dessus définie sans réaction croisée
25 avec d'autres espèces. L'oligonucléotide conforme à l'invention peut
également ne s'hybrider spécifiquement qu'à au moins 10 nucléotides
consécutifs de la région 637-660 de l'ARN 16S de *E. coli*. En effet, avec
deux oligonucléotides reconnaissant des zones adjacentes et ensuite liés
par une ligase, on obtient un oligonucléotide plus long et donc plus
30 résistant à des conditions d'hybridation plus stringentes.

On peut ainsi utiliser deux oligonucléotides représentant la moitié
gauche et la moitié droite de l'un des oligonucléotides de l'invention, les
faire hybrider avec la cible, les lier par action d'une ligase, et augmenter

5 la température de lavage de manière à éliminer tout petit oligonucléotide non lié. Cette méthode qui réduit le bruit de fond a été proposée par Alves et Carr (1988).

Avantageusement, l'oligonucléotide conforme à l'invention correspond à SEQ ID N° 1.

10 En effet, un oligonucléotide de 24 nucléotides, complémentaire de la susdite région 637-660 de l'ARN 16S de *E. coli* a été synthétisé. Il a été appelé Ec637 et identifié SEQ ID N° 1.

Le marquage a été obtenu par greffage de deux chromophores (fluoresceine ou Texas Red) à chaque extrémité de l'oligonucléotide.

15 L'oligonucléotide-sonde utilisé en hybridation in situ à 42°C en présence de 22% de formamide suivie d'un lavage à 60°C, rend fluorescentes les cellules de *Escherichia coli*, *Shigella dysenteriae*, *Shigella flexneri*, *Shigella boydii* (sauf le sérotype 13), *Shigella sonnei* et *Escherichia fergusonii* (groupe génomique *E. coli*). Elle ne réagit pas avec la plupart
20 des autres espèces et genres testés. Toutefois, il a été observée que l'espèce *Citrobacter koseri* et les espèces de *Cedecea*, restent fluorescentes après lavage à 60°C.

En fait, il faut atteindre une température de l'ordre de 61°C pour que ces espèces ne réagissent plus. Cependant, à 61°C, le groupe
25 génomique *E. coli* est rendu très faiblement fluorescent.

La présente invention concerne donc également un oligonucléotide permettant l'obtention de résultats encore meilleurs en terme de spécificité.

En effet, l'oligonucléotide Ec637 a été modifié au niveau d'un
30 nucléotide situé à une position conservée (invariante) de la séquence d'ARNr 16S correspondante pour créer un mésappariement volontaire. Ce mésappariement a été effectué dans la partie centrale de l'oligonucléotide. La séquence obtenue a été appelée Colinsitu et

5 identifiée SEQ ID N° 2. L'introduction d'un mésappariement central a pour but de fragiliser l'hybride qui sera obtenu. Si une séquence diffère par un seul nucléotide de la séquence 637 à 660 de *E. coli*, cela causera deux mésappariements avec la sonde Colinsitu qui ne s'hybridera pas dans les conditions expérimentales choisies. Cette sonde reste réactive
10 vis-à-vis de l'espèce génomique *E. coli* et devient inactive vis-à-vis de toutes les autres espèces et genres. Cette spécificité se maintient dans une large gamme de température de lavage allant de 51°C à 59°C.

La sonde Colinsitu peut être utilisée en hybridation in situ mais également, en hybridation sur filtre, en milieu liquide, en hybridation
15 réverse, ou comme amorce spécifique dans un système d'amplification génique.

L'invention a également pour objet des oligonucléotides complémentaires des oligonucléotides ci-dessous décrits.

D'autres types de marquage de la sonde (radioactivité, marquage
20 chimique ou enzymatique) sont utilisables pour l'hybridation in situ.

Plus particulièrement, les oligonucléotides conformes à l'invention peuvent être marqués à leur extrémité 3' ou 5' ou aux extrémités 3' et 5'.

L'intérêt de cette sonde, appliquée en hybridation in situ avec
25 examen microscopique des cellules bactériennes ou détection par cytométrie de flux, est de pouvoir détecter, identifier, et dénombrer les cellules de l'espèce génomique *E. coli* dans des échantillons divers tels que prélèvements cliniques et vétérinaires (en particulier urine), eau et autres boissons, aliments, environnement.

30 L'invention a également pour objet un procédé de détection et de visualisation de bactéries de l'espèce génomique *Escherichia coli* (incluant toutes les *Shigella* à l'exception de *S. boydii* sérotype 13) / *Escherichia fergusonii* dans un échantillon comprenant une étape

5 d'hybridation de l'ARN ribosomal des bactéries de ladite espèce génomique avec un oligonucléotique selon l'invention, et plus particulièrement avec un oligonucléotique choisi parmi SEQ ID N° 1 et SEQ ID N° 2.

10 Plus particulièrement, l'hybridation en question peut être une hybridation in situ, une hybridation sur filtre, une hybridation en milieu liquide ou une hybridation reverse.

Par hybridation reverse aux fins de la présente invention, on entend une réaction d'hybridation dans laquelle la sonde oligonucléotidique d'intérêt est immobilisée sur un support, l'acide
15 nucléique à détecter et/ou l'organisme contenant l'acide nucléique à détecter étant présent en solution.

Selon un mode particulier de réalisation d'une réaction d'hybridation reverse selon l'invention, les sondes oligonucléotidiques peuvent être mises en œuvre au sein d'un dispositif de détection
20 comprenant une banque matricielle d'oligonucléotides. Un exemple de réalisation d'une telle banque matricielle peut consister en une matrice d'oligonucléotides-sondes fixés sur un support, la séquence de chaque sonde d'une longueur donnée étant située en décalage d'une ou plusieurs bases par rapport à la sonde précédente, chacune des sondes de
25 l'arrangement matriciel étant ainsi complémentaire d'une séquence distincte de l'ADN ou l'ARN cible à détecter et chaque sonde de séquence connue étant fixée en une position prédéterminée du support. La séquence cible à détecter peut être avantageusement marquée radioactivement ou non radioactivement. Lorsque la séquence cible
30 marquée est mise en contact avec le dispositif matriciel, celle-ci forme des hybrides avec les sondes de séquences complémentaires. Un traitement à la nucléase, suivi d'un lavage, permet d'éliminer les

5 hybridés sondes-séquences cible qui ne sont pas parfaitement complémentaires.

 Du fait de la connaissance précise de la séquence d'une sonde à une position déterminée de la matrice, il est alors possible de déduire la séquence nucléotidique de la séquence d'ADN ou d'ARN cible et de
10 détecter en conséquence d'éventuelles mutations localisées dans l'ADN ribosomal de *E. coli*, et plus particulièrement des mutations affectant la région 637-660 de l'ADN codant pour l'ARNr 16S de *E. coli*.

 Une alternative à l'utilisation d'une séquence cible marquée peut consister en l'utilisation d'un support permettant une détection
15 «bioélectronique» de l'hybridation de la séquence cibles sur les sondes du support matrice, lorsque ledit support est constitué ou comprend un matériau capable d'agir, par exemple, en tant que donneur d'électrons aux positions de la matrice auxquelles un hybride a été formé. Un tel matériau donneur d'électron est par exemple de l'or. La détection de la
20 séquence nucléotidique de l'ADN ou ARN cible est alors déterminée par un dispositif électronique.

 Un exemple de réalisation d'un biocapteur, tel que défini ci-dessus, est décrit dans la demande de brevet européen n° EP-0721 016 (Affymax technologies N.V.) ou encore dans le brevet américain n° US
25 5.202.231 (Crkvenjakov et Drmanac).

 L'invention concerne également l'utilisation d'un oligonucléotide correspondant à SEQ ID N° 1 ou SEQ ID N° 2 ou différant de SEQ ID N° 1 par un nucléotide ou un oligonucléotide complémentaire en tant qu'amorce pour la mise en oeuvre d'un procédé d'amplification génique,
30 tel que la PCR.

 Les oligonucléotides conformes à l'invention peuvent également être utilisés dans une méthode d'inhibition de l'hybridation. En effet, on peut envisager de fixer sur un support (filtre, cupule ou microchip) un

5 oligonucléotide identique ou homologue de la région 637-660 de l'ARN
16S de *E. coli* et de marquer d'une façon quelconque un oligonucléotide
complémentaire à cette région conforme à la présente invention. En
l'absence d'ADN ou d'ARN compétiteurs, les deux oligonucléotides
doivent se réassocier complètement. L'introduction dans le système d'un
10 acide nucléique capable de se réassocier avec l'un ou l'autre des
nucléotides (par exemple un acide nucléique appartenant à l'une des
espèces visées par la présente invention) ou les deux (cas de deux brins
séparés) inhibe la fixation de l'oligonucléotide libre, marqué et conforme
à l'invention sur le support.

15 La présente invention a également pour objet un procédé de
détection et de visualisation de microorganismes par hybridation
permettant d'optimiser la spécificité de la sonde oligonucléotidique
utilisée. En effet, un oligonucléotide est d'autant plus spécifique qu'il
présente des différences nettes dans ses capacités d'hybridation avec
20 d'une part les séquences cibles et d'autre part les autres séquences. Dans
les conditions expérimentales d'hybridation, cette différence est d'autant
plus décelable qu'il existe des différences de séquences (ou
mésappariement) entre le susdit oligonucléotide et la séquence avec
laquelle il est susceptible de s'hybrider. Par conséquent, il devient
25 intéressant d'augmenter artificiellement le nombre de ces
mésappariements en modifiant l'oligonucléotide utilisé pour
l'hybridation au niveau d'un nucléotide généralement très conservé au
niveau de la séquence que l'on cherche à détecter.

Par conséquent, la présente invention concerne un procédé de
30 détection et de visualisation de microorganismes (ou d'un groupe de
microorganismes) par hybridation mettant en œuvre un oligonucléotide
complémentaire à la séquence cible du microorganisme à l'exception
d'un nucléotide localisé dans la partie centrale dudit oligonucléotide. Le

5 nucléotide en question est localisé à une position invariante de la séquence cible des microorganismes et est de préférence en position centrale.

Par exemple, pour un oligonucléotide complémentaire d'une longueur de 20 paires de bases, le nucléotide non complémentaire est
10 localisé entre les positions 7 et 13 incluses selon une numérotation de l'oligonucléotide commençant à son extrémité N-terminale, de préférence, le nucléotide en question est localisé à la position 10.

L'invention concerne donc un procédé de détection et de visualisation telle que ci-dessus décrit appliqué à des bactéries de
15 l'espèce génomique *Escherichia coli* (incluant toutes les *Shigella* à l'exception de *S. boydii* sérotype 13) / *Escherichia fergusonii*.

Ainsi, dans le cadre de la présente invention, l'oligonucléotide complémentaire mis en œuvre dans le susdit procédé est un oligonucléotide conforme à la présente invention ne différant de SEQ ID
20 N° 1 que par un nucléotide et de préférence correspondant à SEQ ID N° 2.

Parmi les applications potentielles de l'invention, on citera plus particulièrement les suivantes :

- Recherche de la confirmation que des souches atypiques de *E.*
25 *coli* appartiennent bien à cette espèce. Les Centres de Référence reçoivent souvent des souches qui pourraient être des *E. coli* atypiques. Elles donnent des réactions biochimiques inhabituelles pour cette espèce comme une réaction négative pour la production d'indole ou de gaz, l'hydrolyse du o-nitrophényl- β -galactopyranoside, l'hydrolyse des béta-glucuronides, des réactions de fermentation inhabituelles, ou une
- 30 croissance très faible dans les milieux usuels. La sonde Colinsitu peut confirmer si ces souches appartiennent à l'espèce génomique *E. coli-E*.

5 *fergusonii*. Si la réaction avec la sonde est positive, il est facile de distinguer *E. fergusonii* par la fermentation de l'adonitol et du cellobiose ;

- Détection, identification et dénombrement de *E. coli* dans l'urine de malades ou d'animaux infectés. La plupart des infections urinaires étant dues à *E. coli* et une infection ou colonisation urinaire se
10 caractérisant par la présence de plus de 1000 ou 10 000 bactéries par ml, une hybridation in situ avec Colinsitu d'une dilution appropriée d'urine devrait permettre de constater la présence et de dénombrer *E. coli* dans les urines en 2 à 3 heures ;

- Détection et dénombrement de *E. coli* dans l'eau et les aliments.
15 *Escherichia coli* est le principal indicateur biologique de contamination fécale de l'eau et des aliments. Il suffit de filtrer une quantité connue et suffisante d'eau et de réaliser l'hybridation in situ sur les filtres ainsi obtenus. Si, à l'aide d'un micromètre et d'un réticule, on connaît le volume filtré rapporté à une surface observée au microscope, il est
20 possible de quantifier le nombre de cellule de *E. coli* dans l'eau. Dans le cas d'aliments qui ne sont pas filtrables et qui ne doivent pas avoir un *E. coli* par 25 g, un enrichissement peut être nécessaire à partir de 25 g d'aliment, l'hybridation *in situ* effectué ensuite sur le milieu de culture indiquera si *E. coli* est présent.

25 L'invention ne se limite pas à la description ci-dessus mais en englobe toutes les variantes. Les exemples ci-après permettent de mieux la comprendre tout en n'étant mentionnés qu'à titre purement illustratif.

EXEMPLES

Souches bactériennes utilisées

30 Au total, 208 souches ont été utilisées pour évaluer la spécificité des sondes.

L'authenticité des souches a été vérifiée en les réidentifiant sur galeries Biotype-100 (BioMérieux, La Balme-les-Grottes, France). Les

5 galeries ont été inoculées selon les instructions du fabricant. L'identification automatique a été obtenue grâce au programme Recognizer (Taxolab Institut Pasteur, Paris) et un ordinateur Macintosh Powerbook 5300ce (Apple Computers).

EXEMPLE 1 : Hybridation in situ

10 Au cours des essais, une séquence de 23 nucléotides appelée Ec465, 5' -GGT AAC GTC AAT GAG CAA AGG TA- 3', reconnaissant la région 465 à 487 de l'ARNr 16S, a aussi été synthétisée. Cette séquence Ec465, correspondant à SEQ ID N° 3, a été utilisée dans un but de comparaison.

15 Une méthode publiée (Trebesius et al., 1994) a été suivie avec quelques modifications. Les cultures ont été diluées en eau distillée stérile pour obtenir une absorbance à 600 nm de 0,010, et 100 µl furent filtrés à travers des filtres PC (Millipore, St Quentin-en-Yvelines, France) de 0,22 µm. La fixation a été effectuée par une solution aqueuse à 3% de paraformaldéhyde. La formamide dans la mixture d'hybridation représentait 22% du volume. La sonde a été ajoutée à la concentration de 25 pmole. L'hybridation a été réalisée à 42°C pendant 2 heures. Après lavage (étape déterminant la spécificité: 20 min à 51°C pour Colinsitu, 60°C pour Ec637, 48°C pour Ec465), les filtres ont été déposés sur des
25 lames de verre, recouverts de 5µl de Vectashield (Vector Laboratories, Burlingame, CA) et d'une lamelle.

Les filtres montés sur lame ont été examinés par épifluorescence en utilisant un microscope BX60 Olympus équipé d'un filtre WIBA (pour la fluorescéine) ou NG (pour le Texas Red) et d'une caméra couleur DEI-
30 470 (Optronics).

Le Tableau montre les résultats obtenus en hybridation in situ avec les sondes fluorescentes Colinsitu, Ec637, et Ec465. Toutes les souches testées de *Escherichia coli*, *Shigella* (sauf *S. boydii* sérotype 13),

5 et *Escherichia fergusonii*, sont rendues fluorescentes par la réaction d'hybridation utilisant la sonde Colinsitu. Aucune autre espèce génomique ne réagit. Lorsque la sonde est Ec637, une réaction est obtenue avec *Citrobacter koseri* et les espèces du genre *Cedecea*.

La sonde Ec465, utilisée en comparaison a réagit faiblement avec
10 *E. coli* et avec des souches de *Buttiauxella* et l'expérience n'a pas été poussée plus avant.

Le résultat de l'hybridation in situ, c'est-à-dire les cellules bactériennes rendues fluorescentes, peut aussi être visualisé par cytométrie de flux plutôt que par microscopie.

15

TABLEAU

Réactions obtenues avec les sondes fluorescentes en hybridation in situ.

Espèces	Souche	Réaction avec		
		Colinsitu	Ec637	Ec465
20 Espèce génomique <i>Escherichia coli</i> :				
<i>Escherichia coli</i>	CIP 54.8	+	+	+f
	2430	+	+	+f
	CIP 54-120	+	+	+f
	CIP 54-122	+	+	+f
25	CIP 54-124	+	+	+f
	CIP 70-59	+	+	+f
	CIP 70-68	+	+	+f
	O44	+		
	O52	+		
30	O66	+		
	O90	+		
	O103	+		
	O108	+		
	O110	+		
35	O111	+		
	O113	+		

5		O119	+	
		O121	+	
		O127	+	
		O132	+	
		O135	+	
10		O136	+	
		O140	+	
		O151	+	
		O157:H7	+	
		96-4597	+	
15		6085	+	
		67 Tunis	+	
		K-12 HB101	+	
		H19	+	
		PMK1	+	
20		H30	+	
		E32511	+	
		B2 F1 H21	+	
		OX3 H21	+	
		412	+	
25		HI 8	+	
		96-302	+	
		96-303	+	
		96-301a	+	
	<i>Shigella dysenteriae</i> 1	NCDC 1007-71	+	+
30		Y6R	+	
		60R	+	
	<i>Shigella flexneri</i> 1a	CIP 54-58	+	+
	<i>Shigella boydii</i> 15	NCDC 965-58	+	+
	<i>Shigella sonnei</i>	CIP 52-55	+	+
35	<i>Escherichia fergusonii</i>	1016-74	+	+
		85-11615	+	+
		568-73	+	+

5		29586	+	+
		32-96	+	+
		1-85	+	+
Autres espèces génomiques du genre <i>Escherichia</i> :				
	<i>Escherichia hermanii</i>	1158-78	-	-
10		1200-74	-	-
		3514-77	-	-
		980-72	-	-
	<i>E. vulneris</i>	CDC 2524-69	-	-
		394-83	-	-
15		875-72	-	-
	<i>E. blattae</i>	9005-74	-	-
Autres genres				
	<i>Budvicia aquatica</i>	2377	-	-
		20186HG	-	-
20	<i>Buttiauxella agrestis</i>	CUETM 77-167	-	-
	<i>B. brennerae</i>	S1/6-571	-	-
	<i>B. cochleae</i>	S3/1-49	-	-
	<i>B. ferragutiae</i>	CUETM 78-31	-	-
	<i>B. gaviniae</i>	S1/14-669	-	-
25		CUETM 77-159	-	-
	<i>B. georgiana</i>	CDC 2891-76	-	-
	<i>B. izardii</i>	S3/2-161	-	-
	<i>B.nockiae</i>	NSW 11	-	-
	<i>B. warmboldiae</i>	NSW 326	-	-
30	<i>Cedecea davisae</i>	005	-	+
	<i>C. lapagei</i>	004	-	+
	<i>C. neteri</i>	002	-	+
	<i>Cedecea</i> sp.	001	-	+
	<i>Citrobacter amalonaticus</i>	9020-77	-	-
35	<i>C. braakii</i>	80-58	-	-
	<i>C. farmeri</i>	2991-81	-	-
	<i>C. freundii</i>	621-64	-	-

+f

5	<i>C. koseri</i> (= <i>C. diversus</i>)	3613-63	-	+	-
		8132-86	-	+	-
		8127-86	-	+	-
	<i>C. rodentium</i>	1843-73	-	-	-
	<i>C. sedlakii</i>	4696-86	-	-	-
10	<i>C. werkmanii</i>	876-58	-	-	-
	<i>C. youngae</i>	460-61	-	-	-
	<i>Citrobacter</i> species 10	4693-86	-	-	-
	<i>Citrobacter</i> species 11	2970-59	-	-	-
	<i>Edwardsiella hoshinae</i>	2-78	-	-	-
15	<i>E. ictaluri</i>	92-7041	-	-	-
	<i>E. tarda</i>	10396	-	-	-
	<i>Enterobacter aerogenes</i>	A1	-	-	-
	<i>E. agglomerans</i> group II	3123-70	-	-	-
	groupe III (<i>Pantoea dispersa</i>)	1429-71	-	-	-
20	groupe IV	1471-71	-	-	-
	groupe V	3482-71	-	-	-
	groupe VI (<i>Pantoea ananas</i>)	6070-69	-	-	-
	groupe VII	6003-71	-	-	-
	groupe VIII	5422-69	-	-	-
25	groupe IX	4388-71	-	-	-
	groupe X	1600-71	-	-	-
	groupe XI	5378-71	-	-	-
	groupe XII	219-71	-	-	-
	groupe XIII (<i>Pantoea agglomerans</i>)	E20	-	-	-
30	<i>E. amnigenus</i>	77-118	-	-	-
	<i>E. asburiae</i>	1497-78	-	-	-
	<i>E. cancerogenes</i>	2176	-	-	-
	<i>E. cloacae</i>	CIP 60-85	-	-	-
		77-21	-	-	-
35	<i>E. gergoviae</i>	16-74	-	-	-
	<i>E. hormaechei</i>	491-62	-	-	-
	<i>E. intermedium</i>	77-130	-	-	-

5	<i>E. nimipressuralis</i>	E63	-	-	-
	<i>E. persicinus</i>	HK204	-	-	
	<i>E. pyrinus</i>	4205-93	-	-	-
	<i>E. sakazakii</i>	4562-70	-	-	-
	<i>E. taylorae</i>	2126-81	-	-	-
10	<i>Erwinia carotovora</i>	495	-	-	
	<i>E. carotovora</i> subsp. <i>betavasculorum</i>	E235	-	-	
		2122	-	-	
	<i>E. chrysanthemi</i>	SR32	-	-	
		1451	-	-	
15	<i>E. cypripedii</i>	EC 155	-	-	
	<i>E. mallotivora</i>	2851	-	-	
	<i>E. nigrifluens</i>	EN104	-	-	
	<i>E. rhapontici</i>	1075	-	-	
	<i>E. rubrifaciens</i>	ER 105	-	-	
20	<i>E. stewartii</i>	CNBP 3157	-	-	
	<i>E. uredovora</i>	158	-	-	
	<i>Ewingella americana</i>	23	-	-	
	<i>Hafnia alvei</i> group I	5632-72	-	-	
	<i>H. alvei</i> group II	4510-75	-	-	
25	<i>Klebsiella ornithinolytica</i>	626	-	-	-
	<i>K. oxytoca</i>	131-82	-	-	-
	<i>K. planticola</i>	CIP 100751	-	-	-
	<i>K. pneumoniae</i> subsp. <i>pneumoniae</i>	464	-	-	-
		K2	-	-	-
30		12-52	-	-	
		532	-	-	
	<i>K. pneumoniae</i> subsp. <i>ozaenae</i>	10-79	-	-	-
	<i>K. pneumoniae</i> subsp. <i>rhinoscleromatis</i>	475	-	-	-
	<i>K. terrigena</i>	1	-	-	-
35	<i>Koserella trabulsii</i>	3518-73	-	-	
	<i>Kluyvera ascorbata</i>	648-74	-	-	
	<i>K. cryocrescens</i>	2065-78	-	-	

5	<i>Leclercia adecarboxylata</i>	CUETM 77-3	-	-
		8-82	-	-
	<i>Leminorella grimontii</i>	1944-81	-	-
	<i>Leminorella</i> sp.	3346-72	-	-
	<i>Moellerella wisconsensis</i>	2897-78	-	-
10	<i>Morganella morganii</i>	25830	-	-
	<i>Obesumbacterium proteus</i>	NCIMB 8771	-	-
		CIP 104862	-	-
	<i>Pragia fontium</i>	2434	-	-
	<i>Proteus mirabilis</i>	PM1	-	-
15		PR14	-	-
	<i>P. myxofaciens</i>		-	-
	<i>P. penneri</i>	8.88	-	-
	<i>P. vulgaris</i>	PR1	-	-
	<i>Providencia alcalifaciens</i>	3370-67	-	-
20	<i>P. heimbachae</i>	8025-83	-	-
	<i>P. rettgeri</i>	1163	-	-
	<i>P. rustigiani</i>	132-68	-	-
	<i>P. stuartii</i>	282	-	-
	<i>Rahnella aquatilis</i>	3307	-	-
25	<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>arizonae</i>	44	-	-
	<i>S. enterica</i> subsp. <i>diarizonae</i>	41	-	-
	<i>S. enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serotype ...	6323-88	-	-
	serotype ...	122	-	-
	serotype ...	119	-	-
30	serotype Typhimurium	LT2	-	-
	serotype Gallinarum	4-86	-	-
	<i>S. enterica</i> subsp. <i>houtenae</i>	6700-88	-	-
	<i>S. enterica</i> subsp. <i>salamae</i>	1492-74	-	-
	<i>Serratia entomophila</i>	A1	-	-
35	<i>S. ficaria</i>	4024	-	-
	<i>S. fonticola</i>	5680	-	-
	<i>S. grimesii</i>	503	-	-

5	<i>S. liquefaciens</i>	ATCC 27592	-	-
		275	-	-
	<i>S. marcescens</i>	504	-	-
	<i>S. odorifera</i>	1073	-	-
	<i>S. plymuthica</i>	510	-	-
10	<i>S. proteomaculans</i>	3630	-	-
	<i>S. rubidaea</i>	864	-	-
	<i>Trabulsiella guamensis</i>	370-85	-	-
		371-85	-	-
	<i>Yersinia enterocolitica</i>	ATCC 27729	-	-
15	<i>Y. frederiksenii</i>	CIP 8029	-	-
	<i>Y. intermedia</i>	29908	-	-
	<i>Y. kristensenii</i>	9993	-	-
	<i>Y. pestis</i>	EV40	-	-
	<i>Y. pseudotuberculosis</i>	29833	-	-
20	<i>Y. ruckeri</i>	ATCC 29473	-	-
	<i>Yokenella regensburgei</i>	2403	-	-
		2405	-	-
	Espèces d'autres familles :			
	<i>Acinetobacter</i>	A1745	-	-
25	<i>Aeromonas caviae</i>	67.24	-	-
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	63-52	-	-
	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	DSM 50090	-	-
	<i>P. putida</i>	2066	-	-
	<i>Vibrio alginolyticus</i>	LMG 4408	-	-
30	<i>V. anguillarum</i>	CIP 63-36	-	-
	<i>V. cholerae</i>	CIP 62-13	-	-
	<i>V. harveyi</i>	ATCC 1426	-	-
	<i>V. hollisae</i>	CIP 101886	-	-
	<i>Xanthomonas maltophilia</i>	2377	-	-
35	-----			

5 Légendes

- + : bonne fluorescence des cellules bactériennes
+f : fluorescence faible
- : absence de fluorescence
10 (rien) : expérience non effectuée.

EXEMPLE 2 : Amplification génique

L'oligonucléotide Colinsitu (non marqué) et le nucléotide suivant
15 (complémentaire de la région conservée 8-32 de l'ARNr 16S): 5'-ATT
TGA AGA GTT TGA TCA TGG CTC AG-3' (SEQ ID N° 4) ont été
utilisés comme amorce pour l'amplification spécifique du gène codant
l'ARNr 16S de *E. coli*. La trousse d'amplification "GeneAmp[®] DNA
Amplification Reagent Kit" (Perkin Elmer Cetus, Norwalk, CT) a été
20 utilisée selon les instructions du fabricant, avec la DNA polymérase
"AmpliTaq[™]" et un thermocycleur "DNA Thermal Cycler 480" (Perkin
Elmer Cetus). Le volume réactionnel était de 100 µl comprenant 10 µl de
tampon, 2,5 unités d'AmpliTa^q, 200 µM de chaque nucleotide dATP,
dGTP, dCTP, dTTP, 100 pMole de chaque amorce et 30 à 50 ng d'ADN
25 total. Les conditions d'amplification ont été les suivantes: dénaturation
initiale à 94°C pendant 3 minutes, 25 cycles de 60 s à 94°C pour la
dénaturation, 60 s à 65,5°C pour la réassociation, 120 s à 72°C pour
l'élongation. Le produit d'amplification a été soumis à une électrophorèse
en 1,3% d'agarose (Appligène, Illkirch, France). La taille attendue du
30 fragment amplifié était d'environ 600 paires de bases. L'utilisation de ce
système permet effectivement d'amplifier ce fragment spécifiquement
pour l'espèce génomique *Escherichia coli-Shigella-E. fergusonii*.

5 **EXEMPLE 3 : Hybridation sur filtre**

L'hybridation sur filtre de nitrocellulose, de nylon, ou de cellulose, est une méthode pratique permettant d'appliquer une même sonde à un grand nombre (une centaine) d'échantillons d'ADN. L'hybridation peut se faire sur colonies. Dans ce cas, la membrane est
10 appliquée sur des colonies, imprégnée de soude (lyse les bactéries, détruit l'ARN, et dénature l'ADN), et mise en présence de la sonde marquée dans un tampon adéquat. Après un temps d'exposition suffisant (plusieurs heures), la membrane est lavée, séchée au four (pour fixer irréversiblement l'ADN), et le marquage est révélé. Cette méthode
15 nécessite d'avoir des colonies sur une boîte, mais permet de sélectionner une colonie réagissant parmi des milliers. Un protocole semblable permet de filtrer 96 échantillons sur une membrane traitée de la même façon que les colonies.

20 **EXEMPLE 4 : Hybridation en milieu liquide**

Si un échantillon est traité de manière à lyser les bactéries et à extraire l'ADN, celui-ci peut être dénaturé et mis à hybrider avec une sonde radioactive (125I, par exemple). La radioactivité associée à l'ADN hybridé peut être comptée (comptage γ) après séparation, par
25 chromatographie sur hydroxyapatite, de la radioactivité associée à la sonde non hybridée.

EXEMPLE 5 : Hybridation reverse

Des sondes oligonucléotidiques peuvent être fixées sur un support
30 (filtre, microplaque, microchip). Plusieurs sondes peuvent ainsi être disponibles sur un même support. Le gène-cible est amplifié et marqué, et l'amplicon est mis dans les conditions d'hybridation avec le panel de sondes. Après lavage et révélation du marquage, la fixation du marquage

5 sur une des sondes permet l'identification. Cette approche permet aussi la
détection simultanée de plusieurs organismes lorsque l'amplification est
effectuée sur de l'ADN extrait d'un prélèvement plurimicrobien (Rijpens
et al., 1995). Bien que le travail publié utilise comme cible l'espace
intergénique entre les gènes codant les ARNr 16 et 23S, cette approche
10 est applicable au gène codant l'ARNr 16S.

EXEMPLE 6 : Spécificité de la sonde Colinsitu

Il est maintenant bien établi que les espèces du genre *Shigella* (sauf
S. boydii sérotype 13) appartiennent à l'espèce génomique *Escherichia*
15 *coli* (Brenner et al., 1973). Il n'est donc pas surprenant que la sonde
Colinsitu réagisse avec les *Shigella*. Dans le genre *Escherichia*, *E.*
fergusonii présente 59 à 63 % d'homologie avec *E. coli* (par hybridation
des ADN) avec une instabilité thermique des molécules hybridées de
4,5°C (Farmer et al., 1985). Donc les souches de *E. fergusonii*
20 remplissent partiellement les critères qui les feraient inclure dans l'espèce
génomique *Escherichia coli*. Rappelons que ces critères sont une
homologie supérieure ou égale à 70 % avec une instabilité thermique des
molécules hybridées inférieure ou égale à 5°C (Wayne et al., 1987). Ces
critères devant être interprétés avec souplesse (Wayne et al., 1987). La
25 sonde Colinsitu est donc strictement spécifique de l'espèce génomique *E.*
coli si l'on admet *E. fergusonii* dans cette espèce génomique.

La comparaison de la spécificité de la sonde Colinsitu avec celle
d'autres sondes qui ont été ou pourraient être proposées, apparaîtra
clairement avec des souches de référence suivantes données à titre
30 d'exemple:

Souches devant être visualisées par Colinsitu dans les conditions décrites:

Escherichia coli CIP 54.8 (= ATCC 11775)

Shigella dysenteriae sérotype 1 NCDC 1007-71

- 5 *Shigella flexneri* sérotype la CIP 54-58
Shigella boydii sérotype 15 NCDC 965-58
Shigella sonnei CIP 52-55
Escherichia fergusonii CIP 103357 (= ATCC 35469)
Souches ne devant pas être visualisées par Colinsitu dans les conditions
- 10 décrites:
Shigella boydii sérotype 13 CDC 1610-55
Escherichia vulneris CDC 875-72 (= ATCC 33821)
Escherichia hermannii CDC 980-72 (= ATCC 33650)
Citrobacter koseri (= *C. diversus*) CDC 3613-63 (= ATCC 27156)
- 15 *Citrobacter braakii* 80-58 (= ATCC51113)
Cedecea davisae CIP 80.34 (= ATCC 33431)
Cedecea lapagei CIP 80.35 (= ATCC 33432)
Cedecea neteri CIP 103241 (= ATCC 33855)
Klebsiella pneumoniae subsp. *pneumoniae* K2
- 20 *Obesumbacterium proteus* CIP 104862
Salmonella enterica sérotype Typhimurium (= *S. typhimurium*) LT2 (= CIP 60.62, ATCC 43971).

REFERENCES

Alves, A.M., Carr, F.J. 1988. Dot blot detection of point mutations with adjacently hybridising synthetic oligonucleotide probes. *Nucleic Acid Research* 16 : 8723.

Amann, R. I., Krumholz, L., & Stahl, D. A. 1990. Fluorescent-oligonucleotide probing of whole cells for determinative, phylogenetic, and environmental studies in microbiology. *Journal of Bacteriology* 172: 762-770.

Berent, S. L., Mahmoudi, M., Torczynski, R. M., Bragg, P. W., & Bollon, A. P. 1985. Comparison of oligonucleotide and long DNA fragments as probes in DNA and RNA dot, Southern, Northern, colony and dot hybridizations. *Biotechniques* 3: 208-220.

Brenner, D. J., Fanning, G. R., Johnson, K. E., Citarella, R. V., & Falkow, S. 1969. Polynucleotide sequence relationships among members of the Enterobacteriaceae. *J. Bacteriol.* 98: 637-650.

Brenner, D. J., Fanning, G. R., Miklos, G. V., and Steigerwalt, A. G. 1973. Polynucleotide sequence relatedness among *Shigella* species. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 23: 1-7.

Brosius, J., Palmer, L., Kennedy, J. P., & Noller, H. F. 1978. Complete sequence of a 16S ribosomal RNA gene from *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America* 75: 4801-4805.

Cha, R. S., Zarbl, H., Keohavong, P., & Thilly, W. G. 1992. Mismatch amplification mutation assay (MAMA): application to the c-H-ras gene. PCR Methods Applic. 2: 14-20.

De Smedt, J. & De Ley, J. 1977. Intra- and intergeneric similarities of *Agrobacterium* ribosomal ribonucleic acid cistrons. International Journal of Systematic Bacteriology 27: 222-240.

DeLong, E. F., Wickham, G. S., & Pace, N. R. 1989. Phylogenetic stains: ribosomal RNA-based probes for the identification of single cells. Science 243: 1360-1363.

De Zuane, J. 1997. Handbook of drinking water quality. 2nd ed. Van Nostrand Reinhold, New York.

Doi, R. H. & Iragashi, R. T. 1965. Conservation of ribosomal and messenger ribonucleic acid cistrons in *Bacillus* species. Journal of Bacteriology 90: 384-390.

Farmer, J. J., III, Fanning, G. R., Davis, B. R., O'Hara, C. M., Riddle, C., HickmanBrenner, F. W., Asbury, M. A., Lowery, V. A., III, and Brenner, D. J. 1985. *Escherichia fergusonii* and *Enterobacter taylorae*, two new species of Enterobacteriaceae isolated from clinical specimens. J. Clin. Microbiol. 21: 77-81.

Fox et al., 1977. Comparative cataloguing of 16S ribosomal ribonucleic acid molecular approach to procaryotic systematics. International Journal of Systematic Bacteriology 27 : 44-57.

Galpin et al. 1981. The use of ribosomal DNA (rDNA) hybridization for detection of *Mycoplasma pulmonis* in chronically infected mouse joints. Official Abstract vol. 47, No. 3.

Gillespie, D. & Spiegelman, S. 1965. A quantitative assay for DNA-RNA hybrids with DNA immobilized on a membrane. *J. Mol. Biol.* 12: 829-842.

Giovannoni, S. L., DeLong, E. F., Olsen, G. J., & Pace, N. R. 1988. Phylogenetic groupspecific oligodeoxynucleotide probes for identification of single microbial cells. *Journal of Bacteriology* 170: 720-726.

Göbel, U. B., Geiser, A. & Stanbridge, E. J. 1987. Oligonucleotide probes complementary to variable regions of ribosomal RNA discriminate between *Mycoplasma* species. *Journal of General Microbiology* 133: 1969-1974.

Göbel, U., Maas, R., Havn, G., Vinge-Martins, C., & Stanbridge, E. J. 1987. Synthetic oligonucleotide probes complementary to rRNA for group and species-specific detection of mycoplasmas. *Israel Journal of Medical Science* 23: 742-746.

Göbel, U. B. & Stanbridge, E. J. 1984. Cloned mycoplasma ribosomal RNA genes for the detection of mycoplasma contamination in tissue cultures. *Science* 226: 1211-1213.

Grimont, P.A.D. 1988. Use of DNA reassociation in bacterial classification. *Canadian Journal of Microbiology* 34, 541-546.

- Johnson, J. L., R. S. Anderson, & Ordal, E. J. 1970. Nucleic acid homologies among oxidase-negative *Moraxella* species. *Journal of Bacteriology* 101: 568-573.
- Kohne, D. E. 1968. Isolation and characterization of bacterial ribosomal RNA cistrons. *Biophysical Journal* 8: 1104-1118.
- Kwok, S., Kellog, D. E., McKinney, N., et al. 1990. Effects of primer-template mismatches on the polymerase chain reaction: human immunodeficiency virus type 1 model studies. *Nucleic Acid Research* 18: 999-1005.
- Lampel, K. A., Keasler, S. P., & Hanes, D. E. 1996. Specific detection of *Salmonella enterica* serotype Enteritidis using the polymerase chain reaction. *Epidemiology and Infection* 116: 137-145.
- Moore, R. L. & McCarthy, B. J. 1967. Comparative study of ribosomal ribonucleic acid cistrons in enterobacteria and myxobacteria. *J. Bacteriol.* 94: 1066-1074.
- Pace, B. & Campbell, L. L. 1971. Homology of ribosomal ribonucleic acid of diverse bacterial species with *Escherichia coli* and *Bacillus stearothermophilus*. *Journal of Bacteriology* 107: 543-547.
- Palleroni, N. J., Kunisawa, R., Contopoulou, R., & Doudoroff, M. 1973. Nucleic acid homologies in the genus *Pseudomonas*. *International Journal of Systematic Bacteriology* 23: 333-339.

Rijpens, N. P., Jannes, G., Van Asbroeck, M., Herman, L. M. F., Rossau, R. 1995. Simultaneous detection of *Listeria* spp. and *Listeria monocytogenes* by reverse hybridization with 16S-23S rRNA spacer probes. *Mol. Cell. Probes* 9, 423-432.

Sogin, S. J., Sogin, M. L., & Woese, C. R. 1972. Phylogenetic measurement in procaryotes by primary structural characterization. *J. Mol. Evol.* 1: 173-184.

Takahashi, M., Saito, M., & Ikeda, Y. 1967. Species specificity of the ribosomal RNA cistrons in bacteria. *Biochim. Biophys. Acta* 134: 124-133.

Trebesius, K., Amann, R., Ludwig, W., M hlegger, K., and Schleifer, K.-H. 1994. Identification of whole fixed bacterial cells with nonradioactive 23 S rRNA-targeted polynucleotide probes. *Applied Environ. Microbiol.* 60: 3228-3235.

Wayne, L.G., Brenner, D.J., Colwell, R.R., Grimont, P.A.D., Kandler, O., Krichevsky, M.I., Moore, L.H., Moore, W.E.C., Murray, R.G.E., Stackebrandt, E., Starr, M.P., Tr per, H. G. 1987. Report of the ad hoc committee on reconciliation of approaches to bacterial systematics. *International Journal of Systematic Bacteriology* 37, 463-464.

Woese, C. R., Fox, G. E., Zablen, L., Uchida, T., Bonen, L., Pechman, K., Lewis, B. J., & Stahl, D. 1975. Conservation of primary structure in 16S ribosomal RNA. *Nature* 254: 83-86.

REVENDICATIONS

1. Oligonucléotide capable de s'hybrider spécifiquement à l'ARN ribosomal (ARNr) ou au gène correspondant (ADNr) de l'espèce génomique *Escherichia coli* (incluant toutes les *Shigella* à l'exception de *S. boydii* sérotype 13) / *Escherichia fergusonii*.
2. Oligonucléotide selon la revendication 1 capable de s'hybrider spécifiquement à la région 637-660 de l'ARNr 16S de *E. Coli*.
3. Oligonucléotide selon la revendication 2 capable de s'hybrider spécifiquement avec au moins 10 nucléotides de la région 637-660 de l'ARNr 16S de *E. coli*
4. Oligonucléotide selon l'une des revendications 1 à 3, caractérisé en ce qu'il correspond à SEQ ID N° 1.
5. Oligonucléotide selon l'une des revendications 1 à 3, caractérisé en ce qu'il diffère d'un nucléotide de SEQ ID N° 1.
6. Oligonucléotide selon la revendication 3, caractérisé en ce qu'il correspond à SEQ ID N° 2.
7. Oligonucléotide complémentaire de l'oligonucléotide selon l'une des revendications 1 à 6.
8. Oligonucléotide selon l'une des revendications 1 à 7, caractérisé en ce qu'il est marqué à son extrémité 3' ou 5' ou aux extrémités 3' et 5'.

9. Procédé de détection et de visualisation de bactéries de l'espèce génomique *Escherichia coli* (incluant toutes les *Shigella* à l'exception de *S. boydii* sérotype 13) / *Escherichia fergusonii* dans un échantillon comprenant une étape d'hybridation de l'ARN ribosomal des bactéries de ladite espèce génomique avec un oligonucléotide selon l'une des revendications 1 à 8.

10. Procédé selon la revendication 9, caractérisé en ce que l'oligonucléotide est choisi parmi SEQ ID N° 1 et SEQ ID N° 2.

11. Procédé selon l'une des revendications 9 ou 10, caractérisé en ce que l'hybridation est une hybridation in situ, une hybridation sur filtre, une hybridation en milieu liquide ou une hybridation reverse.

12. Utilisation d'un oligonucléotide selon l'une des revendications 4 à 7 en tant qu'amorce pour la mise en oeuvre d'un procédé d'amplification génique.

13. Procédé de détection et de visualisation de microorganismes par hybridation caractérisé en ce qu'il met en oeuvre un oligonucléotide complémentaire à la séquence cible desdits microorganismes, à l'exception d'un nucléotide localisé dans la partie centrale dudit oligonucléotide.

14. Procédé de détection et de visualisation selon la revendication 13, caractérisé en ce que le nucléotide non complémentaire est localisé à une position invariante chez lesdits microorganismes.

15. Procédé de détection et de visualisation selon la revendication 13 ou 14, caractérisé en ce que les microorganismes sont des bactéries de l'espèce génomique *Escherichia coli* (incluant les *Shigella* à l'exception de *S. boydii* sérotype 13) / *Escherichia fergusonii*.

16. Procédé de détection et de visualisation selon la revendication 15, caractérisé en ce que l'oligonucléotide complémentaire mis en œuvre est tel que défini dans la revendication 5 ou 6.

LISTE DE SEQUENCES

(1) INFORMATIONS GENERALES:

(i) DEPOSANT:

- (A) NOM: INSTITUT PASTEUR
- (B) RUE: 28 RUE DU DOCTEUR ROUX
- (C) VILLE: PARIS
- (E) PAYS: FRANCE
- (F) CODE POSTAL: 75015

(ii) TITRE DE L' INVENTION: OLIGONUCLEOTIDES POUR LA DETECTION ET LA VISUALISATION DE BACTERIES APPARTENANT A L'ESPECE GENOMIQUE ESCHERICHIA COLI DANS UN ECHANTILLON

(iii) NOMBRE DE SEQUENCES: 4

(iv) FORME DECHIFFRABLE PAR ORDINATEUR:

- (A) TYPE DE SUPPORT: Floppy disk
- (B) ORDINATEUR: IBM PC compatible
- (C) SYSTEME D' EXPLOITATION: PC-DOS/MS-DOS
- (D) LOGICIEL: PatentIn Release #1.0, Version #1.30 (OEB)

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 1:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 24 paires de bases
- (B) TYPE: nucléotide
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN

(ix) CARACTERISTIQUE:

- (A) NOM/CLE: Ec637

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 1:

GAGACTCAAG CTTGCCAGTA TCAG

24

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 2:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 24 paires de bases
- (B) TYPE: nucléotide
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN

(ix) CARACTERISTIQUE:

- (A) NOM/CLE: Colinsitu

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 2:

GAGACTCAAG ATTGCCAGTA TCAG

24

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 3:

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
 - (A) LONGUEUR: 23 paires de bases
 - (B) TYPE: nucléotide
 - (C) NOMBRE DE BRINS: simple
 - (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN

- (ix) CARACTERISTIQUE:
 - (A) NOM/CLE: Ec465

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 3:

GGTAACGTCA ATGAGCAAAG GTA

23

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 4:

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
 - (A) LONGUEUR: 26 paires de bases
 - (B) TYPE: nucléotide
 - (C) NOMBRE DE BRINS: simple
 - (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 4:

ATTTGAAGAG TTTGATCATG GCTCAG

26

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Internat'l Application No
PCT/FR 98/01737

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 6 C07H21/00 C12Q1/68

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC 6 C07H C12Q

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	GENE, vol. 128, 1993, pages 13-17, XP002061371 Cf. sequence 39.	1-3,5
A	US 5 084 565 A (PARODOS KYRIAKI ET AL) 28 January 1992 cited in the application Cf. claims 1-10	1,9,13

☐ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

17 November 1998

Date of mailing of the international search report

25/11/1998

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040. Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Riolo, J

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

information on patent family members

International Application No

PCT/FR 98/01737

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 5084565 A	28-01-1992	AT 119207 T	15-03-1995
		DE 68921392 D	06-04-1995
		DE 68921392 T	19-10-1995
		EP 0357306 A	07-03-1990
		JP 2238899 A	21-09-1990
<hr/>			

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Dem: Internationale No
PCT/FR 98/01737

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE
CIB 6 C07H21/00 C12Q1/68

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)
CIB 6 C07H C12Q

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si cela est réalisable, termes de recherche utilisés)

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	GENE, vol. 128, 1993, pages 13-17, XP002061371 Cf. sequence 39.	1-3,5
A	US 5 084 565 A (PARODOS KYRIAKI ET AL) 28 janvier 1992 cité dans la demande Cf. revendications 1-10	1,9,13

☐ Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

☒ Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

* Catégories spéciales de documents cités:

- "A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- "E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- "L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- "O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- "P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

"T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention

"X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément

"Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier

"&" document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

17 novembre 1998

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

25/11/1998

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale
Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Riolo, J

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Demr Internationale No

PCT/FR 98/01737

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
US 5084565 A	28-01-1992	AT 119207 T	15-03-1995
		DE 68921392 D	06-04-1995
		DE 68921392 T	19-10-1995
		EP 0357306 A	07-03-1990
		JP 2238899 A	21-09-1990
<hr/>			

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☒ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☒ FADED TEXT OR DRAWING
- ☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☒ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.

THIS PAGE BLANK (USPTO)